

Moss seedling by sterile culture of plant tissue

Publication number: JP5268843 (A)

Publication date: 1993-10-19

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A01H4/00; A01H11/00; C12N5/04; A01H4/00; A01H11/00; C12N5/04; (IPC1-7): C12N5/04; A01H4/00

- European: A01H4/00D; A01H11/00

Application number: JP19920097102 19920324

Priority number(s): JP19920097102 19920324; FR19930011275 19930922; GB19930019560 19930922; US19930125207 19930923

Also published as:

 JP2700741 (B2)

 GB2282822 (A)

 US5476523 (A)

 FR2710232 (A1)

Abstract of JP 5268843 (A)

PURPOSE: To obtain cultured species capable of readily forming dense communities of the mosses and a method for cultivating the mosses in which the dense communities can readily be formed and cultivated in a short time. **CONSTITUTION:** A plant tissue such as a gametophyte, a protonema, a spore or a callus of mosses is purely cultured, mass-proliferated in a culture tank and differentiated to a young plant body [corresponding to a plumule in a moss sowing method (for loosening or cutting a mat of mosses collected in field, sowing the cut pieces on a nursery bed, germinating young buds and acclimatizing the buds)], which is then taken out, used as a cultured species of mosses and sown so as to provide a desired community density on a nursery bed. Thereby, the cultured species are converted into an adult.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

Abstract of Patent Publication (unexamined) No. 5-268843

Publication number of unexamined Japanese application: 5-268843

Date of publication of application: 19.10.1993 (October 19, 1993)

Application number: 4-97102

Date of filing: 24.3.1992 (March 24, 1992)

Title of the invention: Cultured species of mosses and a method of culturing mosses using the same

Applicant: Hiraoka Environmental Science Laboratory

Inventor: Shozaburo HIRAOKA

Abstract:

PROBLEMS TO BE SOLVED: To provide cultured species which easily produce a dense colony of mosses and a method of culturing mosses in which a dense moss colony can be easily formed by using such cultured species and capable of culturing in a short period of time.

MEANS TO SOLVE THE PROBLEMS: Plant tissues such as moss gametophytes, protonemata, spores, calluses, and the like are subject to a pure culture, mass-multiplied in a culture tank, and differentiated to seedling plants (which correspond to plumules in a method of sowing mosses), which are taken out to be used as the cultured species of mosses and sown onto a nursery so as to provide a desired colony density, thereby maturing to full size.

This is English translation of ABSTRACT OF JAPANESE PATENT PUBLICATION (unexamined) No. 5-268843 translated by Yukiko Naka.

DATE: January 30, 2009

FAÇADE ESAKA BLDG. 23-43, ESAKACHO 1CHOME, SUITA, OSAKA, JAPAN



Yukiko Naka

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平5-268843

(43)公開日 平成5年(1993)10月19日

(51)Int.Cl. ⁵ A 01 H 4/00 // C 12 N 5/04	識別記号 8502-2B	序内整理番号 7236-4B	F I C 12 N 5/00	技術表示箇所 F
---	-----------------	-------------------	--------------------	-------------

審査請求 有 請求項の数 5 (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平4-97102	(71)出願人 592085746 財団法人平岡環境科学研究所 神奈川県川崎市麻生区細山8丁目8番
(22)出願日 平成4年(1992)3月24日	(72)発明者 平岡 正三郎 神奈川県川崎市麻生区細山8丁目8番 財 団法人平岡環境科学研究所内

(54)【発明の名称】 コケ類の培養種、及びそれを用いたコケ類の栽培方法

(57)【要約】

【目的】 コケ類の緻密な群落の形成の容易な培養種、及びそれを用いた緻密な群落の形成が容易でかつ短期間での栽培の可能なコケ類の栽培方法を提供する。

【構成】 コケ類の配個体や、原糸体、胞子、カルス等の植物組織を純粋培養し、培養タンク内にて大量増殖して、幼植物体(まきゴケ法における幼芽に相当する。)に分化させ、これを取り出してコケ類の培養種として用いて、苗床上に所望の群落密度が得られるように播付けて成体化する。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コケ類の植物組織を純粋培養し、幼植物体に分化させてなることを特徴とするコケ類の培養種。

【請求項2】 請求項1に記載の培養種において、前記植物組織が細胞片、配偶体、カルス、原糸体、胞子、無性芽、地下茎又は仮根であることを特徴とするコケ類の培養種。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の培養種において、前記培養種が乾燥状態にあることを特徴とするコケ類の培養種。

【請求項4】 請求項1又は2に記載の培養種において、前記培養種が培養液中にあることを特徴とするコケ類の培養種。

【請求項5】 (a) コケ類の植物組織を純粋培養し、幼植物体に分化させることによりコケ類の培養種を製造し、(b) 前記培養種を所望の群落密度となるように苗床上に播付け、(c) 成体化することを特徴とするコケ類の栽培方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はコケ類の培養種、及びそれを用いたコケ類の栽培方法に関し、特に、緻密な群落の形成の容易なコケ類の培養種、及びそれを用いた緻密な群落の形成が容易かつ短期間での栽培の可能なコケ類の栽培方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 古来より、庭土を地被植物で被い、庭全体に自然を演出することが行われている。この地被植物の代表的なものとしては、芝が挙げられるが、日本庭園等には芝よりもコケ類が好まれる。

【0003】 コケ類は直射日光に強いものもあるが、種によっては弱いものもあること、成育地盤として沃土が適さないこと、空気中の湿度を葉より吸収して成育することなどから、近年、屋外では、苔庭等の一般的な利用の他、屋上緑化への利用が注目されており、また屋内では、和風情緒を醸し出すためにホテル、料亭、旅館等の鑑賞用としても注目されている。

【0004】 コケ類の美麗さは、花草類のように花に起因するものではなく、多数の個体の集合(群落)により発揮されるものである。しかしながら、コケ類は、その生理生態に不明な箇所が多いため、造園栽培等により大量に栽培するのが困難であり、例えばスナゴケやシッポゴケの栽培は、その栽培に熟練した園芸家に頼らざるをえないというのが現状である。

【0005】 このようなコケ類の栽培方法は、一般に移植法と再生法とに大別される。移植法は、殖やそうとするコケ類を土とともに採集してきて移植するものであり、この方法では、広い面積にコケ類を敷設する場合には適さないという問題がある。

10

20

30

40

50

【0006】 また、再生法は、コケ類の植物体が一般に強い再生力を有する性質を利用するもので、さし芽法、まきゴケ法、株分け法等が挙げられるが、中でもまきゴケ法が一般的である。まきゴケ法は、山野で採集してきたコケ類の群落(マット)をほぐすかあるいは切断し、この切断片を苗床上に播付け、幼芽を発芽させ、順化させる方法である。

【0007】 しかしながら、この方法は、以下のような欠点を有する。すなわち、播付けたコケ類の切断片が全て再生して幼芽を生じることはまれであり、また全ての切断片が再生するとしても、切断片を密生したコケ類の群落の株数に応じて播付けるのは不可能であり、これらにより、初期においては幼芽による群落の密度は粗くなってしまう。緻密な群落を得るには、地下茎からのわき芽や無性芽等が伸び揃うまで待機するしかなく、これには数年の年月を要し、その間調整、管理等が必要であり、手間がかかりすぎる。さらに、例えば30cm×60cmの培地に苗床を作成する場合、切断片を1つ1つ間隔を整ながら播付けていくと、1日に7時間作業を行ったとして、1人当り2~4ケース程度しか作れず、作業効率が著しく低いという問題がある。一方、スギゴケ等のように生長が速く、1年程度で緻密な群落を形成するものもあるが、こういったコケ類は、植物体の寿命が短いので、短期間の内に枯死してしまうという問題がある。これらにより苔庭、苔盤景等は非常に高価なものとなっている。

【0008】 ところで、ミズゴケ等のコケ類は、他の菌類等に対する抗性を有するとともに保水性に優れており、このため蘭等の鉢植えや盆栽等の高価で脆弱な花草・木類の土壤を、これらのコケ類で被うことにより、有害な菌類から防衛し、また極端な乾燥を防ぐことが行われている。しかしながら、こういったコケ類を採取しうることは、山野の保水性を著しく低下させ、地崩れや、洪水を招きやすくし、さらに、一度採取したコケ群落は、自然環境下では復元までに長年月を必要とし、自然保護の点でも深刻な問題となっている。

【0009】 したがって本発明の目的は、コケ類の緻密な群落の形成の容易な培養種、及びそれを用いた緻密な群落の形成が容易かつ短期間での栽培の可能なコケ類の栽培方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】 上記目的に鑑み鋭意研究の結果、本発明者は、コケ類の配偶体や、原糸体、胞子、カルス等の植物組織を純粋培養し、培養タンク内にて大量増殖して、幼植物体(まきゴケ法における幼芽に相当する。)に分化させ、これを取り出してコケ類の培養種として用いて、苗床上に所望の群落密度が得られるように播付けて成体化すれば、密度の高いコケ類の群落が短期間に形成できることを見出し、本発明に想到した。

【0011】すなわち、本発明のコケ類の培養種は、コケ類の植物組織を純粹培養し、幼植物体に分化させてなることを特徴とする。

【0012】また、本発明のコケ類の栽培方法は、(a)コケ類の植物組織を純粹培養し、幼植物体に分化させることによりコケ類の培養種を製造し、(b)前記培養種を所望の群落密度となるように苗床上に播付け、(c)成体化することを特徴とする。

【0013】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、培養の対象となるコケ類とは、せん類とたい類とツノゴケ類とを併せた総称であり、せん類としては、ミズゴケ亜綱、クロゴケ亜綱、マゴケ亜綱（スギゴケ目、シッポゴケ目、ホンマゴケ目など）等が挙げられ、また、たい類としては、ゼニゴケ目、フタマタゴケ目、ウロコゴケ目等が挙げられ、ツノゴケ類としては、ツノゴケ綱が挙げられる。

【0014】苔庭、苔盤景、鉢植等に用いられるコケ類の代表的なものとしては、シッポゴケ、シモフリゴケ、シラガゴケ、ハリガネゴケ等の属のもの他、ミズゴケ科のもの等が挙げられる。

【0015】このようなコケ類の本発明の培養種及びそれを用いた本発明のコケ類の培養方法について以下に説明する。まず、山野からコケ類の植物体、胞子等を採取し、このコケ類の植物組織を純粹培養することにより増殖し、幼植物体へと分化させるか、あるいはコケ類の植物組織を純粹培養することにより幼植物体へと分化させた後、増殖する。

【0016】本発明は、この幼植物体を収穫して、これを培養種とし、この培養種を用いてコケ類を栽培することをその主旨とするものである。なお、本発明において培養種となる幼植物体とは、播きゴケ法等における幼芽の状態に相当するものであるが、後述するような培養対象となる植物組織によって、幼植物体は芽として明らかに確認できる場合や、わずかな隆起としてしか確認できない場合等、種々の場合があるが、いずれの場合にもこれらは、ほぼ100%の割合で発芽、生長可能なものである。

【0017】純粹培養する植物組織としては、コケ類の配偶体、細胞片、胞子、無性芽、地下茎、仮根、原糸体等が挙げられる。また、それぞれの植物組織から誘導されるカルスも用いることができる。

S o l. 1

塩化カルシウム・2水和物
硫酸マグネシウム・7水和物
硫酸マンガン・4~5水和物
ホウ酸
硫酸亜鉛・7水和物
モリブデン酸ナトリウム・2水和物
硫酸銅・5水和物
塩化コバルト・6水和物

【0018】これらの植物組織の中でいずれの形態のものを用いるかは、培養対象となるコケ類の種類により増殖に好適な形態が異なり、また、その方法もコケ類の種類により異なる。さらに、場合によってはそれぞれの植物組織からカルスを誘導し、得られたカルスを増殖した後、幼植物体へと分化させるのが好適な場合もある。

【0019】したがって、コケ類の培養種（幼植物体）の誘導・培養方法としては、例えば以下に示す(A)乃至(I)のような方法が挙げられる。

- (A) 配偶体→幼植物体
- (B) 配偶体→カルス→幼植物体
- (C) 配偶体→原糸体→幼植物体
- (D) 胞子→原糸体→幼植物体
- (E) 胞子→原糸体→カルス→幼植物体
- (F) 無性芽→幼植物体
- (G) 無性芽→カルス→幼植物体
- (H) 細胞片→幼植物体
- (I) 細胞片→カルス→幼植物体
- (J) 原糸体→幼植物体
- (K) 地下茎→幼植物体
- (L) 仮根→幼植物体

【0020】以上の増殖・分化は、培地内で行うが、培地は、固体培地でも液体培地でもよい。例えば後述する各種MS変形培地（Murashige-Skoog 変形培地）を、使用するコケ類の植物形態と、所望とする植物形態とに応じて選択し、さらに必要に応じて植物生長調節物質（キネチン、ベンジルアデニン、インドール-3-酢酸、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸（2, 4-D）等）を添加して使用することができる。

【0021】一般に、コケ類の植物組織はグルコース等の単糖類あるいは二糖類の濃度が高い（2重量%以上）培地では、カルス化しやすく、またカルスは、糖類の濃度が低い（0.4重量%以下）培地では、幼植物体へと分化しやすくなる。

【0022】上記(A)乃至(L)の方法について、MS変形培地を使用した場合を例に説明する。なお、MS変形培地としては、以下に示すS o l. 1~3（溶媒は蒸留水）と、グルコース等の糖類及びビタミン、有機酸、無機酸及びそれらの塩等と、蒸留水とを組合せてなるものを使用する。

【0023】

4,400 mg/リットル
3,700 mg/リットル
223 mg/リットル
62 mg/リットル
107 mg/リットル
2.5 mg/リットル
0.25 mg/リットル
0.25 mg/リットル

5
ヨウ化カリウム

6
8.3 mg/リットル

【0024】

S o 1. 2
リン酸一カリウム

42.5 mg/リットル

【0025】

S o 1. 3
m y o -イノシトール
ニコチン酸
塩酸ビリドキシン
塩酸チアミン

10,000 mg/リットル
50 mg/リットル
50 mg/リットル
10 mg/リットル

【0026】

各種MS変形培地の組成NA-MS培地

S o 1. 1	100 ml/リットル
S o 1. 2	4 ml/リットル
S o 1. 3	10 ml/リットル
グルコース	20 g/リットル
硝酸カリウム	4 g/リットル
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	47 mg/リットル
硫酸鉄・7水和物	27.8 mg/リットル

pH 約5.8

【0027】

AS-MS培地

S o 1. 1	100 ml/リットル
S o 1. 2	4 ml/リットル
S o 1. 3	10 ml/リットル
グルコース	20 g/リットル
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	47 mg/リットル
硫酸鉄・7水和物	27.8 mg/リットル
塩化アンモニウム	44 mM
コハク酸ナトリウム又はフマル酸ナトリウム	33 mM

pH 約5.8

【0028】

ANA-MS培地

S o 1. 1	100 ml/リットル
S o 1. 2	4 ml/リットル
硝酸カリウム	4 g/リットル
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	47 mg/リットル
硫酸鉄・7水和物	27.8 mg/リットル

【0029】

40

AAS-MS培地

S o 1. 1	100 ml/リットル
S o 1. 2	4 ml/リットル
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	47 mg/リットル
硫酸鉄・7水和物	27.8 mg/リットル
塩化アンモニウム	44 mM
コハク酸ナトリウム又はフマル酸ナトリウム	33 mM

pH 約5.8

【0030】

MSF培地

7	8
So 1. 1	10 ml/リットル
So 1. 2	0.4 ml/リットル
So 1. 3	1 ml/リットル
グルコース	2 g/リットル
硝酸カリウム	0.4 g/リットル
エチレンジアミン四酢酸・2ナトリウム	4.7 mg/リットル
硫酸鉄・7水和物	2.78 mg/リットル
塩化アンモニウム	20 mM
コハク酸ナトリウム又はフマル酸ナトリウム	15 mM

pH 約5.8

【0031】培養方法

(A) 配偶体→幼植物体

(1) 無菌化操作

配偶体を1~10mm程度に切断し、これを1/5(5倍に稀釀したことを意味する。以下同じ) NA-M-S培地(固体:寒天、ゲルライト等で固化させたもの、以下同じ)上で、20~25°C、1000~3000 lux程度の光量の光を照射しながら培養し、他の菌類等により汚染された部位を除去した後、再び培養する操作を数回繰り返し、無菌化された配偶体を得る。

【0032】上記無菌化は、例えば、配偶体(無菌化対象となるコケ類の植物組織)をステンレスシリンジホールダー等を用いて、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(商品名:Tween 20)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(商品名:Tween 80)等の非イオン系界面活性剤や、塩化ベンザルコニウム等の陽イオン系界面活性剤溶液(濃度0.1~0.5容量%程度)で40~60秒洗浄し、続いて0.5~1容量%次亜塩素酸ナトリウム液等で滅菌し、その後直ちに無菌蒸留水で十分に洗浄したものを培養し、他の菌類等により汚染された部位が確認されたら、その部分を除去した後、上記操作を繰り返すことを、他の菌類等により汚染された部位が消滅するまで継続することにより行えばよい。

【0033】(2) 幼植物体誘導及び増殖

得られた無菌化配偶体を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-M-S培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5NA-M-S培地に生長調節物質を0.1~10μM添加した培地(液体)中にて、20~25°C、1000~3000 lux程度の光量の光を照射しながら、10~30日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【0034】なお、生長調節物質を培地に添加した場合には、誘導された幼植物体を3~10日で培地から取り出し、1/5NA-M-S培地でよく洗浄した後、生長調節物質を添加していない1/5NA-M-S培地に入れ、培養を継続するのが好ましい。

【0035】増殖は、例えば配偶体を培養液ごと三角フラスコ等の容器に注入し、110~120rpm/minで振りまぜるか、又は偏平フラスコ等の容器に注入し、いわゆる懸濁培養により行えば効率的である。この懸濁培養で、誘導された幼植物体が振りまぜられることにより次々と分

断され、その1片1片がまた幼植物体となるので、無菌幼植物体を大量に培養することができる。

【0036】このようにして培養した幼植物体は、収穫した後、滅菌蒸留水等で十分に培養液を洗い落とし、25~35°Cの温度で通風乾燥させるか、天日により乾燥させるか、あるいは-20~-5°Cで凍結乾燥させることにより、培養種とする。また、培地(培養液)ごとピンズめしたものを培養種とすることもできる。特に通風乾燥あるいは天日により乾燥させるか、凍結乾燥させたものは、長期間(1年以上)保存することができる。

【0037】上記培養工程において得られる培養種(幼植物体)は、当初の配偶体に対して、4~8週間で100~150倍の株数に増殖可能である。

【0038】以上のような方法による培養に適したコケ類としては、以下の属のものが挙げられる。

【0039】①せん類

タチゴケ、ホウオウゴケ、コシッポゴケ、キヌシッポゴケモドキ、ハタキゴケ、シシゴケ、ブルッフゴケ、ツリバリコケモドキ、ヘビゴケ、ツリバリゴケ、イヌノハゴケ、クマデゴケ、ススキゴケ、ユミゴケ、ヘリトリシッポゴケ、オウギゴケ、シッポゴケ、カマシッポゴケ、マツバゴケ、コブゴケ、ヤマゴケ、ミヤマゴケ、ナガバノシッポゴケ、ヤスジゴケ、ナガダイゴケ、シラガゴケ、ナガバヒヨウタンゴケ、エゾネジレゴケ、アミバヒゲゴケ、フタゴゴケ、ダンダンゴケ、ハナシゴケ、ヒロハネジクチゴケ、オウムゴケ、ハマキゴケ、オウゴンゴケ、クロコゴケ、ハリイシバイゴケ、ツツクチヒゲゴケ、タマウチゴケ、センボンゴケ、アナシッポゴケ、イワマセンボンゴケ、エゾネジクチゴケ、センボンウリゴケ、ヨリイトゴケ、ネジレゴケ、クチヒゲゴケ、ニセイシバイゴケ、コゴケ、シモフリゴケ、カサゴケ、ミギハチョウチンゴケ、チョウチンゴケ、タチチョウチンゴケ、ナガミチョウチンゴケ、ヒノキゴケ、コウヤノマンネンゴケ、オオトラノオゴケ、トラノオゴケ、アブラゴケ、コアブラゴケ、ソテツゴケ、クジャクゴケ、シノブゴケ、アップサゴケ、ハイゴケ等。

【0040】②たい類

コマチゴケ、イチョウウキゴケ等。

【0041】(B) 配偶体→カルス→幼植物体

50 (1) 無菌化操作

上記(A)の無菌化操作と同様である。

【0042】(2) カルス誘導

得られた無菌化配偶体をグルコース濃度を4~8重量%に調整した1/5 AS-MS培地(固体)、あるいは1/5 MFS培地(固体)上にて、20~25°C、1500~2000 lux程度の光量の光を照射しながら、30~60日間培養することにより、カルスの形成を促す。

【0043】(3) カルス増殖

誘導したカルスを、グルコース濃度を2~4重量%に調整したAS-MS培地(液体)、あるいは1%に二酸化炭素を富化したAAS-MS培地(液体、光独立栄養培地)中にて20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射し、110~120rpm/minで振りませながら、15~20日間培養することにより、増殖させる。

【0044】上記増殖工程においてカルスは、当初の量に対して、45~90日で100~150倍に増殖可能である。

【0045】なお、増殖したカルスは、グルコース濃度を2重量%に調整したAS-MS培地中にて、保存しておくことができる。

【0046】(4) 幼植物体誘導

得られたカルスを1%に二酸化炭素を富化した1/5 ANA-MS培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5 NA-MS培地(液体)中にて、20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射し、110~120rpm/minで振りませながら、30~60日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【0047】このようにして培養した幼植物体は、上記(A)の方法と同様にして培養種化・保存することができる。

【0048】上記培養工程において得られる培養種(幼植物体)は、当初の配偶体に対して、8~15週間で100~150倍の株数に増殖可能である。

【0049】上述したような方法は、カルス化した方が生長が速いものや、カルスの状態で保存したほうがよいものなどについて好適であり、例えば以下の属(ミズゴケ科)のコケ類に好適である。

【0050】①せん類

タマゴケ、ネジクチゴケ、スギゴケ、タチゴケ、ミズゴケ等。

②たい類

ゼニゴケ、ツボミゴケ、ハネゴケ等。

【0051】(C) 配偶体→原糸体→幼植物体

(1) 無菌化操作

上記(A)の方法の無菌化操作と同様である。

【0052】(2) 原糸体誘導

この配偶体を1/5 ANA-MS培地(固体)上にて、20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射しながら、5~10日間培養することにより、原糸体の形成を促す。

【0053】(3) 幼植物体誘導

誘導した原糸体を1%に二酸化炭素を富化した1/5 ANA-MS培地(液体、光独立栄養培地)あるいは1/5 NA-MS培地(液体)中にて20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射しながら、110~120rpm/minで振りませ、30~60日間培養することにより、幼植物体を誘導する。

【0054】誘導した幼植物体は、上記(A)の方法と同様にして増殖・培養種化・保存することができる。

【0055】上記培養工程において得られる培養種(幼植物体)は、当初の配偶体に対して、5~10週間で100~150倍の株数に増殖可能である。

【0056】上述したような方法は、原糸体化した方が生長が速いものなどについて好適であり、例えば以下の属のコケ類に好適である。

【0057】①せん類

ヤノウエノアカゴケ、ケキンシゴケ、キンシゴケ、タマゴケ、エゾタマゴケ等。

②たい類

ヒシャクゴケ、ゼニゴケ、ツボミゴケ等。

【0058】(D) 胞子→原糸体→幼植物体

(1) 無菌化操作

胞子(帽のついたさくは帽をとる)に対して、上記(A)の方法と同様に無菌化操作を行う。

【0059】(2) 原糸体誘導

得られた無菌化胞子を1/5 ANA-MS培地(固体)上にて、20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射しながら、10~15日間培養することにより、原糸体の形成を促す。

【0060】(3) 幼植物体誘導及び増殖

上記(C)の方法と同様である。

【0061】このようにして培養した幼植物体は、(A)の方法と同様にして、培養種化・保存することができる。

【0062】上述したような方法は、配偶体よりも胞子を用いた方が生長が速いものなどについて好適であり、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

タチゴケ、ニワスギゴケ、ミヤマスギゴケ、スギゴケ、シッポゴケ、シラガゴケ、シモフリゴケ、ヒヨウタンゴケ、ツリガネゴケ、フガゴケ、イシヅチゴケ、オオツボゴケ、ユリゴケ、マルダイゴケ、キンゴケモドキ、ウリゴケ、ハリガネゴケ、アカスジゴケ、ナシゴケ、ホソバゴケ、ヒヨウタンハリガネゴケ、ヘチマゴケ、ムツデチヨウタンゴケ、ウチワチョウタンゴケ、ヒノキゴケ、タマゴケ、ウワバミゴケ、ナガクビサワゴケ、サワゴケ、サンダゴケ、クシノハゴケ、ウシオゴケ、ハイゴケ等。

②たい類

ハネゴケ、ヤステゴケ、ムチゴケ等。

【0063】(E) 胞子→原糸体→カルス→幼植物体

(1) 無菌化操作

11

胞子（帽のついたさくは帽をとる）に対して、上記(A)の方法と同様に無菌化操作を行う。

【0064】(2) 原糸体誘導

上記(B)の方法と同様である。

【0065】(3) カルス誘導

得られた原糸体をグルコース濃度4～8重量%に調整した1/5 A S - M S 培地（固体）、あるいはM F S 培地（固体）上にて、20～25℃、1500～2000lux 程度の光量の光を照射しながら、30～60日間培養することにより、カルスの形成を促す。

10

【0066】(4) カルス増殖

誘導したカルスは、上述した(B)の方法と同様にして増殖させることができる。

【0067】(5) 幼植物体誘導

上記(B)の方法と同様である。

【0068】このようにして培養した幼植物体は、(A)の方法と同様にして、培養種化・保存することができる。

【0069】上述したような方法は、カルス化した方が生長が速いものや、カルス化による保存に好適なものなどについて好適であり、例えば以下の属（ミズゴケ科）のコケ類に好適である。

20

①せん類

ミズゴケ、ネジクチゴケ、コバノチョウチンゴケ、タマゴケ等。

②たい類

ハネゴケ、ケビラゴケ、ムチゴケ等。

【0070】(F) 無性芽→幼植物体

(1) 無菌化操作

無性芽を1～10mm程度に切断し、これに対して上記(A)の方法と同様に無菌化操作を行う。

【0071】(2) 無性芽の増殖

1/5 N A - M S 培地（固体）上で、20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射しながら、10～15日間培養し、無性芽を増殖させる。

【0072】(3) 幼植物体誘導

得られた無菌化無性芽を1%に二酸化炭素を富化した1/5 A N A - M S 培地（液体、光独立栄養培地）、あるいは1/5 N A - M S 培地（液体）に生長調節物質を0.1～10μM添加した培地中にて、20～25℃、1000～3000 lux 程度の光量の光を照射しながら、110～120rpm/min で振りませ、15～30日間培養することにより、幼植物体の形成を促す。

40

【0073】このようにして培養した幼植物体は、(A)の方法と同様にして、増殖・培養種化・保存することができる。

【0074】上記培養工程において得られる培養種（幼植物体）は、当初の無性芽に対して、4～8週間で100～150倍の株数に増殖可能である。

【0075】上述したような方法は、無性芽からの方が

50 に分化を促す。

12

増殖が速いものなどについて好適であり、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

ヘチマゴケ、ヨツバゴケ、シッポゴケ、コバノチョウチンゴケ等。

②たい類

ゼニゴケ、フタマタゴケ、ジャゴケ等。

【0076】(G) 無性芽→カルス→幼植物体

(1) 無菌化操作

上記(F)の方法と同様である。

【0077】(2) カルス誘導

得られた無菌化無性芽をグルコース濃度を4～8重量%に調整した1/5 A S - M S 培地（固体）、あるいはM F S 培地（固体）上にて、20～25℃、1500～2000lux 程度の光量の光を照射しながら、30～60日間培養することにより、カルスの形成を促す。

【0078】(3) カルス増殖

誘導したカルスは、上記(B)の方法と同様にして増殖することができる。また、上記(B)の方法と同様にしてカルスを保存することもできる。

【0079】(4) 幼植物体誘導

得られたカルスは、上記(B)の方法と同様にして幼植物体へと誘導することができる。

【0080】このようにして培養した幼植物体は、(A)の方法と同様にして、培養種化・保存することができる。

【0081】上記培養工程において得られる培養種（幼植物体）は、当初の無性芽に対して、8～17週間で100～150倍の株数に増殖可能である。

【0082】上述したような方法は、カルス化した方が増殖・保存が好適なコケ類について好適であり、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

ハマキゴケ、ヘチマゴケ、アカイチイゴケ、コモチイトゴケ等。

②たい類

ゼニゴケ、フタマタゴケ、ヒメクサリゴケ等。

【0083】(H) 細胞片→幼植物体

(1) 無菌化操作

細胞片（植物体等から採取したもの）を1～10mm程度に切断し、これに対して、上記(A)の方法と同様に無菌化操作を行う。

【0084】(2) 幼植物体誘導

得られた無菌化細胞片を1%に二酸化炭素を富化した1/5 A N A - M S 培地（液体、光独立栄養培地）、あるいは1/5 N A - M S 培地（液体）に生長調節物質を0.1～10μM添加した培地中にて、20～25℃、1000～3000 lux 程度の光量の光を照射しながら、110～120rpm/min で振りませ、30～60日間培養することにより、幼植物体

【0085】このようにして培養した幼植物体は、(A)の方法と同様にして、増殖・培養種化・保存することができる。

【0086】上述したような方法は、例えば以下の属(ミズゴケは科)のコケ類に好適である。

①せん類

スギゴケ、シラガゴケ、シッポゴケ、ハイゴケ、ミズゴケ等。

②たい類

コマチゴケ、ツボミゴケ、フタマタゴケ等。

【0087】(I) 細胞片→カルス→幼植物体

(1) 無菌化操作

上記(I)の方法と同様である。

【0088】(2) カルス誘導

得られた無菌化細胞片をグルコース濃度を4~8重量%に調整した1/5 AS-MS培地(固体)、あるいはMF S培地(固体)上にて20~25°C、1500~2000lux程度の光量の光を照射しながら、30~60日間培養することにより、カルスの形成を促す。

【0089】(3) カルス増殖

誘導したカルスは、上記(B)の方法と同様にして増殖することができる。また、上記(B)の方法と同様にしてカルスを保存することもできる。

【0090】(4) 幼植物体誘導

得られたカルスは、上記(B)の方法と同様にして幼植物体へと誘導することができる。

【0091】このようにして培養した幼植物体は、(A)の方法と同様にして、培養種化・保存することができる。

【0092】上述したような方法は、例えば以下の属(ミズゴケは科)のコケ類に好適である。

①せん類

タチゴケ、スギゴケ、ネジクチゴケ、ミズゴケ等。

②たい類

ハネゴケ、ウキゴケ等。

【0093】(J) 原糸体→幼植物体

(1) 無菌化操作

原糸体を1~10mm程度に切断し、これに対して上記(A)の方法と同様に無菌化操作を行う。

【0094】(2) 原糸体増殖

得られた無菌化原糸体を1/5 NA-MA培地(固体)上で、20~25°C、1000~3000 lux程度の光量の光を照射しながら、5~10日間培養することにより、増殖させる。

【0095】(3) 幼植物体誘導及び増殖

この原糸体を1%に二酸化炭素を富化した1/5 ANA-MA培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5 NA-MA培地(液体)に生長調節物質を0.1~10μM添加した培地中にて、20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射しながら、110~120rpm/minで振りま

ぜ、30~60日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【0096】このようにして培養した幼植物体は、(A)の方法と同様にして、培養種化・保存することができる。

【0097】上記培養工程において得られる培養種(幼植物体)は、当初の原糸体に対して、6~10週間で100~150倍の株数に増殖可能である。

【0098】上述したような方法は、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

キンシゴケ、ヤノウエノアカゴケ、タマゴケ等。

②たい類

ゼニゴケ、ヒシャクゴケ、ツボミゴケ等。

【0099】(K) 地下茎→幼植物体

(1) 無菌化操作

地下茎を1~10mm程度に切断し、これに対して上記(A)の方法と同様に無菌化操作を行う。

【0100】(2) 幼植物体誘導

20 得られた無菌化地下茎を1%に二酸化炭素を富化した1/5 ANA-MA培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5 NA-MA培地(液体)に生長調節物質を0.1~10μM添加した培地中にて、20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射し、110~120rpm/minで振りまぜながら、10~30日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【0101】誘導した幼植物体は、(A)の方法と同様にして増殖・培養種化・保存することができる。

【0102】上記培養工程において得られる培養種(幼植物体)は、当初の地下茎に対して、3~4週間で100~150倍の株数に増殖可能である。

【0103】上述したような方法は、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

カサゴケ、イワダレゴケ、コウヤノマンネンゴケ、フジノマンネンゴケ等。

【0104】(L) 仮根→幼植物体

(1) 無菌化操作

仮根を1~10mm程度に切断し、これに対して、上記(A)の方法と同様に無菌化操作を行う。

【0105】(2) 幼植物体誘導

得られた無菌化仮根を1%に二酸化炭素を富化した1/5 ANA-MS培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5 NA-MS培地(液体)に生長調節物質を0.1~10μM量%添加した培地(液体)中にて、20~25°C、1000~3000lux程度の光量の光を照射しながら、110~120rpm/minで振りまぜ、10~30日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【0106】誘導した幼植物体は、(A)の方法と同様にして増殖・培養種化・保存することができる。

【0107】上記培養工程において得られる培養種（幼植物体）は、当初の仮根に対して、3～4週間で100～150倍に増殖可能である。

【0108】上述したような方法は、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

シモフリゴケ、シッポゴケ、ダチョウゴケ、シノブゴケ等。

②たい類

タマチゴケ、ムチゴケ、ゼニゴケ等。

【0109】以上本発明のコケ類の培養種の製造方法と、それを適用するのに好適なコケ類とを例示してきたが、本発明はこれに限定されず、培地等は通常の純粋培養で使用されているものを適宜使用してよい。また、カルス化は、増殖・保存の点で必要があれば、適宜行うことができ、例えばカルス化工程を包含しない培養種化方法においても、必要に応じカルス化工程を導入することができる。なお、上記以外に特殊な培養方法を用いることがある。例えばヒカリゴケの場合には、上述した(I)の栽培方法において、原糸体を増殖させた段階で終了し、それを培養種とするのが好ましい。

【0110】また、上記各培養工程において、得られた培養種（幼植物体）は、再度培養槽に投入することにより、同じ品質の培養種を永久に継代培養することができる（コケ類のクローン化）。

【0111】次に上述したような方法により得られた培養種を用いた本発明のコケ類の栽培方法について説明する。まず、上述した培養種を苗床に播付ける。播付け密度は、所望とする群生密度に応じて適宜設定すればよいが、一般に苔庭等に用いる場合には、1cm²当たり培養種が5～20個程度となるように播付ける。また播付け方法は、例えば乾燥体としてある場合には、そのまま播付けるか、あるいは水にもどして播付ければよく、また培養種が培養液ごと保存してある場合には、水洗して播付ければよい。なお、水分は特に付与する必要はないが、大気及び苗床が乾燥状態にある場合には、霧吹き等により、苗床がわずかに湿る程度に水分を付与するのが好ましい。

【0112】また、苗床には、日向土、鹿沼土、バーミキュライト、ピートモス、腐葉土、川砂等の砂土を単独で、あるいは2種以上混合して用いるのが一般的であるが、上記以外に発泡性パーライト（商品名：アクアソイル等）、高分子吸水体（商品名：スミカゲル等）なども用いることができる。上記の他に、木炭粉末等を少量添加してもよい。また、苗床に砂土を用いる場合、砂土は煮沸、あるいはオーブンで焼く等して滅菌しておくのが好ましい。

【0113】上述したような播付けは、栽培地（苔庭や苔盤景等）に直接行ってもよいが、栽培用パレット（10～30cm×20～60cm程度のもの）に播付けておき、ある程

度生長し密生化した段階で、移植するのが好ましい。また、大規模な栽培場に行う場合には、その栽培場に直接播付けてもよいし、栽培用パレットを大量に敷設してもよい。

【0114】播付け後、コケ類を150～240日管理する。例えばスナゴケの場合、播付け後6ヶ月である程度生長した群落を得ることができる。上記管理は、ビニルハウスや、ケーシング内に収めることにより、風雨の影響を排除して行うことができる。緑色が濃く、健康的なコケ群落を得るには、天日及び外気に直接触れる状態下で管理するのが好ましい。また、ビニルハウスや、ケーシング内に収めることにより、風雨の影響を排除して栽培すると、色合いがやや薄緑のものとなり、環境の変化に対する順応性の弱いものとなってしまうが、確実かつより短期間で成育できるので、外観をあまり問題としない用途（鉢植え、盆栽等の土壤の滅菌用）等に用いるのに好適である。

【0115】その後、栽培地（苔庭や苔盤景）に移植し、10～15日順化させることにより、コケの群落の栽培を完了する。

【0116】なお、上記栽培工程においては、コケ類の生長が一様でなかったり、場所によって群落密度が異なる場合には、必要に応じ間引きや、密度の小さい箇所にさらに本発明の栽培種を播付けて、群落密度が一様となるように調整することができる。

【0117】通常の播きゴケ法においては、コケ類の切断片を播付けて幼芽を生じるまでは30～60日程度を要し、しかも、全ての切断片から幼芽を生じることはまれである。また全ての切断片から幼芽を生じたとしても、極めて緻密に播付けた場合でも、コケ類の群落密度は小さいものである。

【0118】したがって、初期群落形成時においては、コケ類の群落は過疎状態であり、地下茎や仮根等からのわき芽の発芽及びその生長に伴い、徐々に群落密度が緻密化していく、800～1100日を経て完成する。例えばカモジゴケの場合には900～1000日を要する。

【0119】しかしながら、本発明においては、コケ類をその再生に好適な条件下で純粋培養することにより、極めて短期間に大量の幼植物体（培養種）を製造し、この幼植物体は、ほぼ確実に発芽するものであるので、これを緻密に播付けることにより、従来より大幅に短期間で緻密な群落を形成することができる。

【0120】上述したような本発明のコケ類の栽培方法において、純粋培養の開始から、完了までの期間は、栽培するコケ類の種類にもよるが、200～300日程度であり、例えばカモジゴケの場合には210～240日程度であり、上記播きゴケ法よりも大幅に栽培日数が短縮される。

【0121】さらに、播きゴケ法においては、人間の手作業により、1つ1つの裁断片を苗床に播付けている

が、本発明の培養種は、幼植物体を乾燥状態あるいは培養液中に保存してなるので、それを緻密に播くだけで、播付けを完了することができ、播付けの作業効率を大幅に向上することができる。

【0122】

【実施例】本発明を以下の具体的実施例により、さらに詳細に説明する。

【0123】実施例1

カモジゴケの植物体を採取し、配偶体の部分だけ分別し、この配偶体をハサミにより、約5mm程度に切断し、無菌化処理の後、この切断片1個を1/5NA-M S培地(8%の寒天で固化させたもの)上で、25°C、2000luxの光量の光を照射しながら、培養し、他の菌類等により汚染された部位を除去した後、再び培養する操作を、5回繰り返し、無菌化された配偶体を得た。

【0124】このようにして得られた無菌化配偶体を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-M S培地(液体)に生長調節物質(キネチン)を1μM添加した溶液とともに、振とう培養機に投入して、25°C、2000luxの光量の光を照射し、110rpm/minで振りませながら、7日間培養することにより、幼植物体に分化を促した。

【0125】この幼植物体を培地から取り出し、1/5NA-M S培地でよく洗浄した後、生長調節物質を添加していない1/5NA-M S培地にいれ、同様の条件下でさらに6週間培養し、もとの無菌配偶体に対して、約100倍の株数の幼植物体を得た。これを滅菌蒸留水等で十分に培養液を洗い落とし、30°Cの温度で通風乾燥することにより、培養種とした。

【0126】この培養種を培地(30cm×60cm×3cmの栽培用パレットに1cmの厚さに砂を敷設したもの)上に、1cm²当り培養種が約5個となるように播付け、栽培した。

【0127】180日経過後、カモジゴケは緻密な群落を形成しており、苔庭等の栽培地に移植可能な状態となっていた。

【0128】比較例1

実施例1と同じ群落のカモジゴケを1株づ手でほぐし、これを実施例1と同様の培地上に、30本×30本の密度で播付け、栽培した。

【0129】180日経過後、カモジゴケは実施例1のものと比べて生長が著しく遅く、さらに群落のまばらなものであり、栽培地に移植するには不可能な状態であった。

【0130】実施例2

ヒノキゴケの胞子体を採取し、このさくの部分だけ分別し、帽を除去し無菌化処理した後、胞子を取り出した。この胞子を1/5NA-M S培地(8%の寒天で固化させたもの)上で、25°C、2000luxの光量の光を照射しながら、培養し、他の菌類等により汚染された部位を除去した後、再び培養する操作を、5回繰り返し、無菌

化された胞子を得た。

【0131】この胞子を1/5NA-M S培地(8%の寒天で固化させたもの)上で、25°C、2000luxの光量の光を照射しながら、14日間培養することにより、原糸体を形成させた。

【0132】このようにして得られた無菌化原糸体を集め、1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-NS培地に生長調節物質(キネチン)を1μM添加した溶液とともに、振とう培養機に投入して、25°C、2000luxの光量の光を照射し、110rpm/minで振りませながら、7日間培養することにより、幼植物体に分化を促した。

【0133】この幼植物体を培地から取り出し、1/5NA-M S培地でよく洗浄した後、生長調節物質を添加していない1/5NA-M S培地にいれ、同様の条件下でさらに50日培養した。この幼植物体を滅菌蒸留水等で十分に培養液を洗い落とし、30°Cの温度で通風乾燥することにより、培養種とした。

【0134】この培養種を培地(30cm×60cm×3cmの栽培用パレットに1cmの厚さに砂を敷設したもの)上に、1cm²当り培養種が約5個となるように播付け、栽培した。

【0135】180日経過後、ヒノキゴケは緻密な群落を形成しており、苔庭等の栽培地に移植可能な状態となっていた。

【0136】実施例3

ネジケチゴケの胞子体を採取し、このさくの部分だけ分別し、帽を除去し、無菌化処理した後、胞子を取り出した。この胞子を1/5NA-M S培地(8%の寒天で固化させたもの)上で、25°C、2000luxの光量の光を照射しながら培養し、他の菌類等により汚染された部位を除去した後、再び培養する操作を、5回繰り返し、無菌化された胞子を得た。

【0137】この胞子を1/5NA-M S培地(固体)中にて、25°C、2000luxの光量の光を照射しながら、14日間培養することにより、原糸体を形成させた。

【0138】得られた原糸体をグルコース濃度4重量%に調整した1/5AS-M S培地(固体)上にて、25°C、1500luxの光量の光を照射しながら、50日間培養することにより、カルスを形成させた。

【0139】このようにして得られたカルスを1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-M S培地に生長調節物質(キネチン)を1μM添加した溶液とともに、振とう培養機に投入して、25°C、2000luxの光量の光を照射し、110rpm/minで振りませながら、50日間培養することにより、幼植物体に分化を促した。

【0140】この幼植物体を培地から取り出し、1/5NA-M S培地でよく洗浄した後、生長調節物質を添加していない1/5NA-M S培地にいれ、同様の条件下でさらに50日培養した。

【0141】このようにして得られた幼植物体を滅菌蒸

留水等で十分に洗浄し、30℃の温度で通風乾燥することにより、培養種とした。

【0142】この培養種を培地（30cm×60cm×3cmの栽培用パレットに1cmの厚さに砂を敷設したもの）上に、1cm² 当り培養種が約5個となるように播付け、栽培した。

【0143】180日経過後、ネジクチゴケは緻密な群落を形成しており、苔庭等の栽培地に移植可能な状態となっていた。

【0144】

【発明の効果】以上詳述した通り、本発明においては、配偶体、カルス、原糸体等のコケ類の植物組織を純粋培養し、培養タンク内にて大量増殖して、短期間で幼芽の

状態に相当する幼植物体に分化させ、これをコケ類の培養種として用いて、苗床上に所望の群落密度が得られるように播付けて、成体化することにより、コケ類を栽培しているので、従来より大幅に短期間でコケ類の緻密な群落を形成することができる。

【0145】また、本発明のコケ類の栽培方法によれば、播付けはコケ類の幼芽の状態に相当する幼植物体（培養種）を所望の密度に播くだけでよく、従来人間の手作業に頼らざるを得なかった播付け作業の効率が大幅に向上したものとなっている。

【0146】このような本発明のコケ類の栽培方法により、性質の異なる様々なコケ類の緻密な群落を短期間で大量かつ容易に栽培することが可能となる。

【手続補正書】

【提出日】平成4年4月7日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正内容】

【0039】①せん類

タチゴケ、ホウオウゴケ、コシッポゴケ、キヌシッポゴケモドキ、ハタキゴケ、シシゴケ、ブルラッポゴケ、ツリバリゴケモドキ、ヘビゴケ、ツリバリゴケ、イヌノハゴケ、クマデゴケ、ススキゴケ、ユミゴケ、ヘリトリシッポゴケ、オウギゴケ、シッポゴケ、カマシッポゴケ、マツバゴケ、コブゴケ、ヤマゴケ、ミヤマゴケ、ナガバノシッポゴケ、ヤスジゴケ、ナガダイゴケ、シラガゴケ、ナガバヒヨウタンゴケ、エゾネジレゴケ、アミバヒゲゴケ、フタゴゴケ、ダンダンゴケ、ハナシゴケ、ヒロハネジクチゴケ、オウムゴケ、ハマキゴケ、オウゴンゴケ、クロコゴケ、ハリイシバイゴケ、ツツクチヒゲゴケ、タマウチゴケ、センボンゴケ、アナシッポゴケ、イワマセンボンゴケ、エゾネジクチゴケ、センボンウリゴケ、ヨリイトゴケ、ネジレゴケ、クチヒゲゴケ、ニセイシバイゴケ、コゴケ、シモフリゴケ、カサゴケ、ミギハチョウチングケ、チョウチングケ、タチチョウチングケ、ナガミチョウチングケ、ヒノキゴケ、コウヤノマンネンゴケ、オオトラノオゴケ、トラノオゴケ、アブラゴケ、コアブラゴケ、ソテツゴケ、クジャクゴケ、シノブゴケ、アツブサゴケ、ハイゴケ等。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正内容】

【0094】（2）原糸体増殖

得られた無菌化原糸体を1/5NA-MS培地（固体）

上で、20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射しながら、5～10日間培養することにより、増殖させる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正内容】

【0095】（3）幼植物体誘導及び増殖

この原糸体を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地（液体、光独立栄養培地）、あるいは1/5NA-MS培地（液体）に生長調節物質を0.1～1.0μM添加した培地中にて、20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射しながら、110～120 rpm/minで振りませ、30～60日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正内容】

【0100】（2）幼植物体誘導

得られた無菌化地下茎を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地（液体、光独立栄養培地）、あるいは1/5NA-MS培地（液体）に生長調節物質を0.1～1.0μM添加した培地中にて、20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射し、110～120 rpm/minで振りませながら、10～30日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0128

【補正方法】変更

【補正内容】

【0128】比較例1

実施例1と同じ群落のカモジゴケを1株ずつ手でほぐ*

*し、これを実施例1と同様の培地上に、30本×30本の密度で播付け、栽培した。

【手続補正書】

【提出日】平成4年8月14日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正内容】

【0035】増殖は、例えば配偶体を培養液ごと三角フラスコ等の容器に注入し、110～120 rpmで振りまぜるか、又は偏平フラスコ等の容器に注入し、いわゆる懸濁培養により行えれば効率的である。この懸濁培養で、誘導された幼植物体が振りまぜられることにより次々と分断され、その1片1片がまた幼植物体となるので、無菌幼植物体を大量に培養することができる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正内容】

【0043】(3)カルス増殖

誘導したカルスを、グルコース濃度を2～4重量%に調整したAS-MS培地(液体)、あるいは1%に二酸化炭素を富化したAAS-MS培地(液体、光独立栄養培地)中にて20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射し、110～120 rpmで振りまぜながら、15～20日間培養することにより、増殖させる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正内容】

【0046】(4)幼植物体誘導

得られたカルスを1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5NA-MS培地(液体)中にて、20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射し、110～120 rpmで振りまぜながら、30～60日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正内容】

【0053】(3)幼植物体誘導

誘導した原糸体を1%に二酸化炭素を富化した1/5A

NA-MS培地(液体、光独立栄養培地)あるいは1/5NA-MS培地(液体)中にて20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射しながら、110～120 rpmで振りまぜ、30～60日間培養することにより、幼植物体を誘導する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正内容】

【0072】(3)幼植物体誘導

得られた無菌化無性芽を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5NA-MS培地(液体)に生長調節物質を0.1～10 μM添加した培地中にて、20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射しながら、110～120 rpmで振りまぜ、15～30日間培養することにより、幼植物体の形成を促す。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正内容】

【0079】(4)幼植物体誘導

得られたカルスは、上記(B)の方法と同様にして幼植物体へと誘導することができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0084

【補正方法】変更

【補正内容】

【0084】(2)幼植物体誘導

得られた無菌化細胞片を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5NA-MS培地(液体)に生長調節物質を0.1～10 μM添加した培地中にて、20～25℃、1000～3000 lux程度の光量の光を照射しながら、110～120 rpmで振りまぜ、30～60日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正内容】

【0095】(3)幼植物体誘導及び増殖

この原糸体を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MA培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5NA-MS培地(液体)に生長調節物質を0.1~1.0 μ M添加した培地中にて、20~25℃、1000~30001ux程度の光量の光を照射しながら、110~120rpmで振りませ、30~60日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正内容】

【0100】(2) 幼植物体誘導
得られた無菌化地下茎を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MA培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5NA-MS培地(液体)に生長調節物質を0.1~1.0 μ M添加した培地中にて、20~25℃、1000~30001ux程度の光量の光を照射し、110~120rpmで振りませながら、10~30日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正内容】

【0103】上述したような方法は、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

カサゴケ、イワダレゴケ、コウヤノマンネングサ、フジノマンネングサ等。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0105

【補正方法】変更

【補正内容】

【0105】(2) 幼植物体誘導
得られた無菌化仮根を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地(液体、光独立栄養培地)、あるいは1/5NA-MS培地に生長調節物質を0.1~1.0 μ M添加した培地(液体)にて、20~25℃、1000~30001ux程度の光量の光を照射しながら、110~120rpmで振りませ、10~30日間培養することにより、幼植物体に分化を促す。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0108

【補正方法】変更

【補正内容】

【0108】上述したような方法は、例えば以下の属のコケ類に好適である。

①せん類

シモフリゴケ、シッポゴケ、ダチョウゴケ、シノブゴケ等。

②たい類

コマチゴケ、ムチゴケ、ゼニゴケ等。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正内容】

【0124】このようにして得られた無菌化配偶体を1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地(液体)に生長調節物質(キネチン)を1 μ M添加した溶液とともに、振とう培養機に投入して、25℃、20001uxの光量の光を照射し、110rpmで振りませながら、7日間培養することにより、幼植物体に分化を促した。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正内容】

【0132】このようにして得られた無菌化原糸体を集め、1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地に生長調節物質(キネチン)を1 μ M添加した溶液とともに、振とう培養機に投入して、25℃、20001uxの光量の光を照射し、110rpmで振りませながら、7日間培養することにより、幼植物体に分化を促した。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0137

【補正方法】変更

【補正内容】

【0137】この胞子を1/5NA-MS培地(固体)にて、25℃、20001uxの光量の光を照射しながら、14日間培養することにより、原糸体を形成させた。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0139

【補正方法】変更

【補正内容】

【0139】このようにして得られたカルスを1%に二酸化炭素を富化した1/5ANA-MS培地に生長調節物質(キネチン)を1 μ M添加した溶液とともに、振とう培養機に投入して、25℃、20001uxの光量の光を照射し、110rpmで振りませながら、50日間培養することにより、幼植物体に分化を促した。